

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

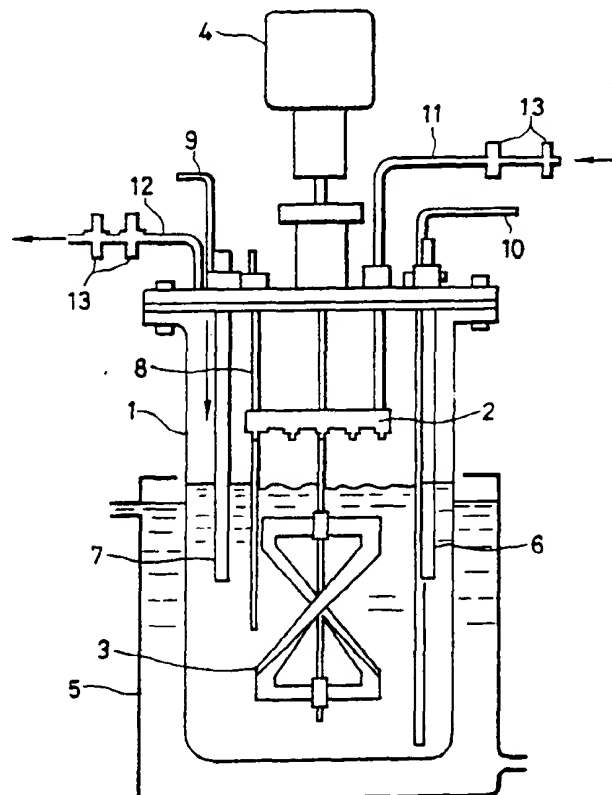
(51) 国際特許分類 ⁴ C12M 3/00, C12N 5/00 // C12M 1/06	A1	(11) 国際公開番号 WO 88/ 60965 (43) 国際公開日 1988年2月11日 (01.02.88)
(21) 国際出願番号 PCT/JP87/00573 (22) 国際出願日 1987年7月31日 (31. 07. 87) (31) 優先権主張番号 特願昭61-185131 (32) 優先日 1986年8月8日 (08. 08. 86) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 日立製作所 (HITACHI, LTD.)(JP/JP) 〒101 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 石橋 整 (ISHIBASHI, Tadashi)(JP/JP) 〒317 茨城県日立市会瀬町三丁目23番22号 Ibaraki, (JP) 川口英夫 (KAWAGUCHI, Hideo)(JP/JP) 〒316 茨城県日立市西成沢町一丁目36番2号301 Ibaraki, (JP) 吉野小枝子 (YOSHINO, Saeko)(JP/JP) 〒317 茨城県日立市大みか町六丁目6番6号304 Ibaraki, (JP) 緒田原啓二 (ODAWARA, Yoji)(JP/JP) 〒316 茨城県日立市西成沢町四丁目21番6号 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 小川勝男 (OGAWA, Katsuo) 〒100 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 株式会社日立製作所 特許部内 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), KR, SE (欧州特許), U.S. 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR INCUBATING ANIMAL CELLS

(54) 発明の名称 動物細胞の培養方法及び培養装置

(57) Abstract

A method and an apparatus for incubating animal cells in an incubation tank of a mechanical stirring system, wherein a culture solution is stirred while restricting the disturbance of the liquid level and formation of vortex, and an oxygen-containing gas is continuously ejected from a blow nozzle towards the liquid level to form recesses having an inversed conical shape on the liquid level. According to the present invention, the gas-liquid interface area can be increased by the recesses described above and the ejected gas is forced to form the flow from the bottoms of the recesses to the liquid level along the inner liquid surface of the recesses having an inversed conical shape, thereby improving the renewal ratio of the gas-liquid interface. Accordingly, migration of the gas materials can be promoted between the gaseous phase at the upper part of the incubation tank and the liquid phase of the culture solution while preventing bubbling of the culture solution.



(57) 要約

本発明は、動物細胞を機械攪拌式の培養槽にて培養するに当り、培養液の攪拌を液面の乱れやボルテックス形成を抑えながら行ない、かつ吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて連続的に吐出し、液面に逆円錐状の凹みを形成させて動物細胞の培養を行なう方法及び装置である。

したがって、本発明によれば、上記凹みによる気液界面積の増加と、吐出ガスが逆円錐状の凹みの液表面内側に沿って凹の底部から液面に向かう流れを強制的に作り気液界面の更新率が高められることにより、培養槽上部の気相と培養液の液相間との気体の物質移動を培養の発泡を抑えて促進できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	KR	モリタニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	KW	マラウイ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NL	オランダ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NO	ノルウエー
BG	ブルガリア	IT	イタリア	RO	ルーマニア
BJ	ベナン	JP	日本	SD	スーダン
BR	ブラジル	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CF	中央アフリカ共和国	KR	大韓民国	SN	セネガル
CG	コンゴ	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CH	スイス	LK	スリランカ	TD	チャード
CM	カメルーン	LU	ルクセンブルグ	TC	トーゴ
DE	西ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		
FI	フィンランド	ML	マリ		

(1)

明 細 書

発明の名称

動物細胞の培養方法及び培養装置

〔産業上の利用分野〕

本発明は細胞の増殖に必要な酸素の供給及び装置に係り、特に機械攪拌式培養槽にて培養するのに好適な動物細胞の培養方法及び培養装置に関する。

〔従来技術〕

機械攪拌式培養槽で動物細胞を増殖させるとき培養槽内上部の気相部に存在する酸素が液面を介して液相部に溶解することで必要な酸素は供給されている。このときの酸素の移動速度（気相から液相への溶解速度）は培養液容量当りの気液界面積及び気液界面の更新に係わる攪拌機（羽根）の回転数の影響を強く受ける。ところが、回転数の増加はせん断力の増大に続き、細胞が損傷を受け死に至る為、限界がある。また動物細胞培養用の培養液に血清を使用する為、通気攪拌を行うと発泡が激しく槽内容積に対する液量比は小さくせねばならない。更には、培養液が泡となつて溢流して培養の継続が不能になつてしまう。その為、微生物培養のように大量通気、強攪拌によつて酸素の移動速度（気相から液相への溶解速度）を上げることができないことから、改良が試みられてきた。

(2)

改良の試みとして、①酸素含有ガスを培養液に通気して、気液界面積を増加させようとするもの、②液面を攪拌し（乱し）、気液界面の更新を促すものがある。①については文献1：〔Ann. New York Acad. Sci. Vol 413 Pp. 361～364 (1983)〕、②については文献2：Biotechnology and Bioengineering, Vol XXV, Pp. 122～125 (1985)において述べられている。しかし、未だ満足すべき装置及び方法は開発されていない。

従来技術には上記したような欠点があり、各所でその改良が試みられているのが現状であるが、問題点を以下に詳述する。

①通気攪拌方式

培養液に酸素含有ガスを吹き込み（通気）、更に攪拌羽根にて液を攪拌すると共に吹き込みガスを液内に分散させることを目的としている。この方法は、ガスが液中で小気泡を形成し、滞留する為気液界面面積が増加し、酸素移動速度が速くなる効果を有する。しかし、動物細胞培養に使用する培養液には血清など蛋白質成分が多く、極めて発泡し易い性質をもっている。また発泡は細胞膜の分解を引き起す（文献1）といわれており、細胞増殖を妨げる原因となる。これらの対策として、消泡剤（界面活性剤）の添加が考えられるが、微生物細胞と異なり、

(3)

動物細胞は界面活性剤に対する抵抗性が弱く、増殖阻害を起す為、使用できない。毒性が弱く、かつ有効なものは見出されていない。

これに対して発泡による損傷から細胞を保護するためにアルギン酸ソーダなどの半透性のカプセルに細胞を包括し、該カプセルを培地内に浮遊させ、案内に酸素含有ガスを吹き込んで発泡状態で培養する発明がある。しかし、この方式ではカプセルを無菌的に調製できる装置が必要であり、培養システムが複雑となる。また、発泡に伴い排気系に培地が入り込むため、除菌フィルターが目詰り防止や配管の清掃施策が要求される。

② 液面攪拌方式

この方法は攪拌軸に液面を乱す為の羽根を設け液面を攪乱し、気液接触面積を増加させようとするものである（文献2）。surface aerator と呼ばれる羽根は低速回転ではそれなりの効果を有するが、高酸素移動速度を得る為に高速回転させると泡立て機と同様の作用となる。そこで気相部に酸素ガスを注入することで酸素移動速度を向上させる試みがなされている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

以上のように、従来技術では操作条件と培養液の発泡性との係りについての配慮が不十分であり、高密度培養実現に対する大きな制限因子の1つになっている。

(4)

本発明の目的は、培養液を発泡させることなく、効率よく酸素を液中に供給できる動物細胞の培養方法及び培養装置を提供することにある。

〔問題点を解決するための手段〕

上記目的は、機械攪拌式の培養槽において液面上部の気相空間に単一もしくは複数個の気体吹き込みノズルを液面に向けて設け、該ノズルから酸素含有ガスを連続的に吐出して液面に逆円錐状の凹みを形成することで達成できる。

第1の発明の特徴は、動物細胞を機械攪拌式の培養槽にて培養するに当り、培養液の攪拌を液面の乱れやボルテックス形成を抑えながら行ない、かつ吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて連続的に吐出し、液面に凹みを形成させる動物細胞の培養方法にある。この場合、上記ノズル先端から静止液面までの距離を h cm とし、ガスの吹き込み量 Q (cm^3/sec) とノズル先端でのガス線速度 v (cm/sec) との積 f_g をとり、この値を $6.25 \times 10^5 \times h^2$ 以下となるように操作することが望ましい。したがって、ノズル穴径 1 mm の場合を考えると、上記ノズルから吐出する酸素含有ガスの液面に対し垂直方向の液面での線速度を 5 m/s 以上 65 m/s 以下とすることが望ましい。

第2の発明の特徴は、動物細胞を機械攪拌式の培養槽

(5)

にて培養する装置において、液面上部の気相空間に酸素含有ガスを連続的に吐出するための単一もしくは複数個の気体吹込みノズルを液面に向けて設置したことを特徴とする動物細胞の培養装置にある。

この場合、培養液を攪拌するための攪拌羽根が中央部を抜いた短形板を1/2回転ひねった構造であることが望ましい。

第3の発明の特徴は、動物細胞を分散した培養液を攪拌機で攪拌しながら培養槽にて培養するにあたり、培養液の液面を実質上平滑に保ちつつ培養液の攪拌を行い、かつ多数の吹き込み穴を有する吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて連続的に吐出し、液面に多数の凹みを形成させ酸素ガスを培養液に溶解する動物細胞の培養方法にある。

第4の発明の特徴は、動物細胞を分散した培養槽の培養液を機械攪拌しながら培養する方法において、培養液の発泡及び該動物細胞の破壊を防止しながら培養液の攪拌をすること、及び吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて吐出し、液面に凹みを形成させながら酸素ガスを培養液に溶解させること、を有する動物細胞の培養方法にある。

第5の発明の特徴は、動物細胞を機械攪拌式の培養槽にて培養するにあたり、培養液の攪拌を液面の乱れやボ

(6)

ルテックス形成を抑えながら行い、かつ吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて連続的に吐出し、液面に凹みを形成し凹みの底部から液面に向かう培養液の流れを形成しつつ酸素ガスを培養液に溶解させる動物細胞の培養方法にある。

第6の発明の特徴は、動物細胞を分散する培養液を収容する培養槽と、該培養液を攪拌する攪拌機と及び該培養液の液面に酸素ガスを供給する手段とを有する培養装置において、液面上部の気相空間に、酸素含有ガスを液面に向けて連続的に吐出するための気体吹き込みノズルを設置した動物細胞の培養装置にある。

第7の発明の特徴は、動物細胞を分散する培養液を収容する培養槽と、該培養液を攪拌する攪拌機と及び該培養液の液面に酸素ガスを供給する手段とを有する培養装置において、液面上部の気相空間に、酸素含有ガスを液面に向けてほぼ垂直に吐出するための気体吹き込みノズルを設置した動物細胞の培養装置にある。

第8の発明の特徴は、動物細胞を分散する培養液を収容する培養槽と、該培養液を攪拌する攪拌機と及び該培養液の液面に酸素ガスを供給する手段とを有する培養装置において、酸素含有ガスを液面に向けてほぼ垂直に吐出するための気体吹き込みノズルと、該ノズルからの吐出圧力を制御し該液面に凹みを形成する制御手段を有す

(7)

る動物細胞の培養装置にある。

第9の発明の特徴は、培養槽の培養液に分散された動物細胞を機械攪拌しながら培養する方法において、培養液の発泡及び該動物細胞の破壊を防止しながら培養液の攪拌をすること、及び吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて垂直方向に5 m/秒～65 m/秒（但しノズルの吹径を1 mmとして計算した場合の液面での線速度）の速度で吐出し、液面に凹みを形成させながら酸素ガスを培養液に溶解させること、を有する動物細胞の培養方法にある。

以下、本発明を図を用いてさらに詳細に説明する。

第1図において、培養槽1は、攪拌羽根3によつて培養液を攪拌する機械攪拌式槽である。攪拌羽根3は、攪拌モーター4の駆動軸に取り付けられ、該攪拌モーター4により回転する。なお、攪拌羽根3の回転は、マグネット方式でも良く、特に限定するものではない。槽内には液面に酸素含有ガスを吐出するガス吹き込み管2、pHセンサー6、溶存酸素センサー7及び温度センサー8が設置されている。また、恒温水槽5は、培養槽1を加温するものである。給気口11及び排気口12に取り付けた除菌フィルター13は0.2～0.45 μ mの孔径であり、酸素含有ガス中の雑菌を除くと同時に排気口12からの雑菌進入を防ぐものである。なお、排気に伴

(8)

う培養液の水の蒸散を抑えるため、培養温度の飽和蒸気圧に近い値で蒸気圧を調整した酸素含有ガスを培養槽 1 に供給する。このため、フィルター材質は結露になる目づまりの少ないテフロンなどの疎水性のものを使用する。

第 2 図は、ガス吹き込み管 2 の一例である。ガス吹き込み管 2 は、緩衝管 2 a , 吹き込みノズル 2 b 及び送気管 2 c により構成される。酸素含有ガスは、送気管 2 c を通して緩衝管 2 a に入り、緩衝管 2 a の下部に取り付けられた各々の吹き込みノズル 2 b から均圧にて連続的に吐出される。吹き込みノズル 2 b のガス吐出面は、液面に向けられるが、好適には静止液面に平行とすると良い。また、吹き込みノズル 2 b の穴径及びガス吐出間の液面までの距離は、吐出したる酸素含有ガスにより液面に逆円錐状の凹みを形成できる条件にあれば良い。ノズル穴径 1 mm の場合には吐出したる酸素含有ガスの液面での垂直方向に対する線速度を 5 m / s 以上となるようにすれば、液面に逆円錐状の凹みを形成できる。吹き込みノズル 2 b の数は、特に限定するものでなく、最大の酸素移動速度の得られる数に設定すると良い。複数個の吹き込みノズル 2 b を設置する場合、液面の凹みが重ならないように平面的に位置を決めると良い。

ところで、液表面の乱れが多い場合、吹き込みノズル 2 b から吐出した酸素含有ガスにより、液内にガスを巻

(9)

き込んで発泡を引き起こす。

また、液表面に深いボルテックスが形成される場合、吹き込みノズル 2 b の液面までの距離が遠くなり液面に凹みが形成されない。したがって、好適な液面は、乱れの少ない平らなものが良い。

液面の乱れやボルテックスの形成は、主に攪拌羽根 3 の形状に左右されるので、適切なものを選定する必要がある。第 1 図に示した中央部の抜けた矩形の攪拌羽根 3 は、液面の乱れやボルテックスの形成を抑えることのできる一例である。

以下、装置に係わる動物細胞の培養操作について第 1 図を用いて述べる。

動物細胞は、固体表面に付着生育するものと、浮遊状態で増殖できるものに大別できる。前者の場合、マイクロキャリアー法、即ち、デキストランなどのマイクロビーズに細胞を付着させて、該ビーズを浮遊させることで、浮遊状態で培養できる。したがって、浮遊培養に係わる本発明は、上記両種の動物細胞に対して使用できる。

培地は、培地供給口 9 から培養槽 1 に無菌的に付込まれる。培地は、ガス吹き込み管 2 を設置するのに必要な最少限の空間（液面からノズル吐出面までの距離も含める）を残して仕込むことができるが、好適な仕込み率は 40～70% である。培養は、培地供給口 9 から種細胞

(10)

が接種されて開始される。培養液の温度は、温度センサー 8 の信号により温度制御計が働き恒温水槽 5 に送られる温水の温度及び流量が調節されて、所要範囲に制御される。培養初期では 5 % 程度の炭酸ガスを含む酸素含有ガスが、液面に凹みを形成しない流量でガス吹き込み管 2 から培養槽 1 の気相部に送られる。増殖に必要な酸素は、該気相部から液面を介して供給される。細胞濃度が低密度では、溶存酸素濃度は、増殖の制限因子となるレベルにない。この時の攪拌羽根 3 の回転数は、細胞を十分に均一分散できる値があれば良い。そして細胞の増殖に伴い酸素消費量が増加し溶存酸素濃度が増殖の制限因子となるレベルにまで低下した時から酸素吹き込みガスにより液面での凹み形成を開始する。即ち、酸素センサー 7 からの信号を受けた溶存酸素制御計により酸素含有ガスの吹き込み量の調整弁を開き、液表面での垂直方向での線速度が 5 m/s 以上となるように吹き込み量を増加させる。増加のイミングは、10～30 分間毎に溶存酸素濃度のレベルを判定して該制限因子となるレベル以下である時とする。また、高レベルの溶存酸素濃度は却つて増殖を阻害する。したがって、溶存酸素濃度を、増殖の制限因子となる値及び増殖阻害を起こす値の間にあるように、吹き込み量を制御することになる。上記範囲内で溶存酸素濃度を上記操作で制御すると、細胞濃度

(11)

の増加と共に酸素含有ガスの吹き込み量は徐々に増加する。ところが、ガス吹き込み管に吹き込んだガス量とノズル先端におけるガス線速度との積である f_g が $6.25 \times 10^5 \times h^2$ より大きくなると、ノズル径 1 mm の場合にはガス吹き込み管 2 の吹き込みノズル 2 b から吐出された酸素含有ガスの液面における垂直方向の線速度が、65 mm/sec より大きくなり、液内に気泡が入り込み、培養液の発泡を引き起こす。即ち、吹き込みガス量には限界がある。したがって酸素含有ガスの吹き込み量が、限界値より大きくなる場合は、酸素含有ガスの酸素分圧を高くすると良い。

ところで、細胞濃度が 1×10^6 個/ml 以上の高密度では、老廃物が蓄積し、また栄養源が不足する。このため、培養液取り出し口 10 から培養液を取り出し、細胞を無菌的に分離する。そして該細胞を新しい培地とともに培地供給口 9 から培養槽 1 に戻す。この操作は間歇的あるいは連続でも良い。なお、細胞の分離方法については特に限定するものでない。ところが、この操作だけでは、pH 値が最適値以下となる。これは、細胞濃度の増加に伴い炭酸ガスの発生量及び発生速度が増加し、溶存炭酸ガス濃度が増加するためである。本発明では、炭酸ガスの液相と気相との交換が良好に行なわれる。したがって、pH センサー 6 の信号を受けた pH 計により、

(12)

酸素含有ガスと炭酸ガスの混合比を変える。即ち、pH値が最適値以下となつた時に炭酸ガスの混合比を下げた酸素含有ガスを吹き込むことで、液相の炭酸ガスを気相に排出してpH値を上昇させることができる。この時、炭酸ガスの混合比の低下割合は、0.1～0.5%として徐々に行うと良い。また、乳酸の蓄積量の多い場合、重炭酸ソーダなどのアルカリ剤の添加を併用すると効果的である。

〔作用〕

前記ノズルから液面に向かつて酸素含有ガスを連続的に吐出せしめ、液面に逆円錐状の凹みを形成させることは、凹みによる気液界面積を増加させること、及び吐出ガスが逆円錐状の凹みの底部から液面に向かう流れを強制的に作ることとなり気液界面の更新率が高められること的作用によつて酸素移動速度を向上させることができる。このとき、ノズルから吐出したる酸素含有ガスの液表面での運動エネルギーを液素面を押し下げる程度とすれば、液表面の張力を破つて液相への酸素含有ガスの入り込みがない。即ち、培養液の発泡を抑えることができる。

以上の作用により、培養液の発泡を抑えて、酸素移動速度を向上させることができる。

図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例の槽内構造図、第2図は該

(13)

槽内に具備したガス吹き込み管の構造図、第3図は該槽内に具備した攪拌羽根の構造図、第4図は液中へのガスの巻込みが起こる臨界値を示す線図、第5図はガスの液中への巻込みが生じ始めたときの f_g 値とノズル穴面と水面との距離との関係を示す線図、第6図はガス吹き込み管のノズルから吐出したる空気の液面での垂直方向の線速度と酸素移動速度係数との関係を示す線図、第7、8図は吹き込み空気量をパラメーターとした攪拌羽根の回転数と酸素移動速度係数との関係を示す線図、第9、10及び11図は培養試験結果で各々細胞濃度、溶存酸素濃度及びpHの経時変化を示す線図である。

〔実施例〕

実施例1

本発明による酸素含有ガス吹き込み機構を有する培養槽における溶存酸素計を用いたガスアウト法により水系での酸素移動容量係数を求めた。

使用した培養槽の構造は、第1図に示すもので、内容積は5ℓである。槽本体は、パイレックスガス製で外径160mm、高さ270mmである。ガス吹き込み管は、14φの管を外径78mmの円型ドーナツ型の融衝管下部にノズル穴径1mmの吹き込みノズル6個を60°間かくでノズル穴面が水平に取り付けた構造である。また、攪拌羽根は、第3図に示す2種を供試した。攪拌羽根Aは、

(14)

幅 80 mm, 高さ 100 mm の板で幅 50 mm, 高さ 60 mm で中央部を抜いた矩形板を 1/2 回転ひねった構造である。攪拌羽根 B は、幅 80 mm, 高さ 100 mm の矩形板を 1/2 回転でひねった構造である。両羽根とも槽底部から 20 mm の位置に底部がくるように攪拌軸に取り付けた。なお、ガス吹込み管や攪拌羽根の材質は S U S 3 1 6 使用した。

上記構造の培養槽に蒸留水 2.5 l を仕込み、ガス吹き込み管は、ノズル穴面が水面から 20 mm となるように取り付けた。まず、窒素ガス液中に通気して、溶存酸素濃度をゼロ付近まで下げ、次いで、槽の気相部を空気で置換後、所定の条件で攪拌及びノズルからの空気の吐出を開始した。溶存酸素計にて溶存酸素濃度の増加の経時変化を求めて、同データから酸素移動容量係数を求めた。なお、測定温度は、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ とし、また、吹き込む空気は予め上記温度の飽和蒸気圧に調整したものを使用した。

第 6 図は、各吹き込み量におけるノズルから吐出したる空気の液面での垂直方向の線速度と酸素移動容量係数を示したものである。攪拌羽根は、A を使用し、回転数は 80 rpm と一定とした。また、空気の通気量は 0 ~ 22 l/min とした。ノズルから吐出したる空気の液面での垂直方向の線速度は、水を抜いた槽にて熱線流量計

(15)

にてノズル吐出面から20 mmでの流速を測定した値を用いた。液面での凹みは、該線速度が5 m/s以上で形成され、それと同時に酸素移動容量係数が増加した。なお、該線速度が5 m/s以下での酸素移動容量係数は、従来法、即ち、槽上部の気相部から液面を通して酸素が移動する場合の値であつた。また、ノズル穴径が1 mmのものは、該線速度65 m/s以上では酸素移動容量係数が、急激に増加した。これは、気泡の液内への巻込が原因であつた。そこで、血清を10%混合して、発泡テストを行つたところ、該線速度が65 m/s以上では、著しい発泡を引き起こすことがわかつた。

次に、攪拌羽根の違いによる効果を検討するため、第3図に示す攪拌羽根AとBにて酸素移動速度係数を測定した。第7図は、攪拌羽根A、第8図は攪拌羽根Bの場合である。前者は、酸素移動速度が攪拌羽根の回転数に比例して増加したのに対して、後者では、80 rpmで最大となり、それ以降減少した。この違いは、前者では攪拌数の回転数が増加しても液面の乱れも少なく平らであるのに対して、後者ではボルテックスを形成するためであることがわかつた。即ち、ノズル吹き出し面から、液面までの距離がボルテックスにより遠くなる液面での空気の線速度が遅くなるためである。この結果から、攪拌羽根は、回転によりボルテックスの生じないものを選定

(16)

しなければならないことがわかった。

ところで、酸素移動速度を向上せしめる方法として、酸素富化ガスを利用すると良い。そこで酸素40%の酸素富化ガスを用いて、酸素移動容量係数を測定した。測定条件は、攪拌羽根Aを用いて、回転数を80rpmと一定とした。また、酸素富化ガスの通気量は、12.5ℓ/mとした。

測定結果を第5図に示す。空気を用いた場合に比べ1.5倍程向上させることがわかった。本発明と酸素富化ガスを組合せることで、より高い酸素移動容量係数が得られ効果的である。

実施例2

実施例1で用いた装置において、ノズル穴径を0.3, 0.4, 1.0, 2.5及び5mmとした場合の各々の条件での酸素移動容量係数を求めた。

測定条件は、次の通りである。各ノズルは、ガス吹き込み管に6個をノズル穴面が水面から20mmとなるように取り付けした。槽内の蒸留水の仕込み量は2.5ℓ、また、攪拌羽根Aを用いて、回転数は80rpm一定とした。なお、測定温度は、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ とし、測定方法は、実施例1と同じガスアウト法である。

測定結果を第4図に示す。図において、fgは、次に述べるようにガス吹き込み管に吹き込んだガス量とノズ

(17)

ル先端におけるガス線速度との積である。

機械設計便覧〔機械設計便覧編集委員会編、丸善株式会社発行、昭和33年(1958)6月25日〕、頁1504において、平板に噴流が直角に当たる場合の平板にかかる力Fは、①式のように示されている。

$$F = (\gamma / g) Q v \quad \dots \textcircled{1}$$

γ は流体の単位体積の重量、 g は重力加速度、 Q は、流量、 v は噴流の速さを示す。

ノズルから噴き出したガスの液面を押す力は上記式より吹き込みガス流量とノズル先端におけるガス線速度との積に比例すると考えられた。ここで、各条件におけるノズル1個当りの吹き込みガス流量 g (cm^3/sec) 及びノズル先端でのガス線速度 v (cm/m) を計算し、吹き込みガスの液面を押す力 F_g を求めた。即ち、ノズル1個当りから吹き出すガスの v 液面を押す力 f は、②式と考えた。

$$f = k \times q \times v \quad \dots \textcircled{2}$$

k : 比例定数

したがって、 F_g は、③式となる。

$$F_g = 6 \times f \quad \dots \textcircled{3}$$

ところで、 q は、④式

$$q = Q_g / 6 \quad \dots \textcircled{4}$$

Q_g : ガス吹き込み管に吹き込んだガス量

(18)

であるので、 F_g は、⑤式となる。

$$F_g = k \times Q_g \times v \quad \dots \textcircled{5}$$

(⑤式において、 $Q_g \times v$ を f_g とした。)

第4図によれば、ノズル穴径を変えても、 f_g が同一であれば、酸素移動容量係数(h^{-1})は、ほぼ同じであることが判明した。即ち、吹き込みガスの液面を押す力が、同一であればノズル穴径を変えても同一の酸素移動容量係数を得られことがわかった。また、各ノズル穴径とも f_g 値が、 2.5×10^6 [(cm/sec)²]では液中にガスを巻き込むのが観察された。

この結果から、予め任意のノズルを用いて酸素移動容量係数と f_g 値との関係を求めておけば、ノズル径を変えた場合において、液面での線速度を測定せずとも f_g 値を計算することで、酸素移動容量係数を求めることができる。

実施例3

実施例2に於いて、ノズル穴面と静止水面との距離を変えた時の吹き込みガスの液中への巻き込みが生じ始める f_g 値を求めた。

第5図に結果を示す。 F_g は、液中へのガス巻き込みが生じ始めた時の f_g 値である。ノズル穴面と水面との距離は、10 mm、20 mm及び40 mmとした。

図よりガスの液中への巻き込みが始まる f_g 値は、ノ

(19)

ズル穴面と水面との距離の二乗に反比例することが判明した。したがって、図からノズル穴面と静止水面との距離を h cm とすると、ガスの液中への巻き込みが生じない f_g 値は、 $6.25 \times 10^5 \times h^2$ 以下とすれば良いことがわかる。

〔実施例 4〕

実施例 1 で使用した培養槽にて培養試験を行つた。なお、比較例として従来法での培養試験を行つた。

供試細胞は、JTC-1 (ラット復水肝ガン由来の株化細胞で浮遊性) を用いた。また、培地は、DM-160

(極東製薬製) に新生仔牛血清 10% 混合したものを使用した。培地の仕込み量は、2.5 l とした。攪拌羽根は、第 3 図の A タイプを使用し、ガス吹き込み管のノズル吹き出し面は、液面から 20 mm とした。

培養条件は、次の通りである。攪拌羽根の回転数は 80 rpm 一定とし、培養温度は、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ にて制御した。酸素含有ガスは、空気と炭酸ガスの混合ガスとし、予め温度 37°C の温水にスパーキングして飽和蒸気圧としたものを使用した。そして 0.45μ の除菌フィルターを通して、槽内に供給した。培養初期では該混合ガスを液面に凹みを形成させない通気量 0.2 l/min で通気した。

なお、炭酸ガス初期の濃度は 5 V/V% とした。吹き

(20)

込み酸素含有ガスによる液面での凹み形成の開始は、溶存酸素濃度が2 ppm 以下となった時点とした。それ以後、溶存酸素濃度が2 ppm となるように、酸素含有ガスの吹き込み量を制御した。炭酸ガスの混合割合の減少は、細胞濃度 1.5×10^6 個/ml の時点から行つた。なお、比較例では、炭酸ガス濃度5 V/V % の空気混合ガスを通気量0.2 l/min一定で通気した。また、老廃物の除去及び栄養源の供給を行うため、途中培地交換を行つた、その交換率は100%とした。

培養結果を第9, 第10, 第11図に示す。第9図に示すように本発明では細胞は、比較例(従来法)と同じ増殖速度で増加し、比較例が細胞濃度 3×10^6 個/ml 程度で頭打ちとなるのに対して 1.2×10^7 個/ml までほぼ指数的に増殖した。培養期間を通してのpH値は第11図に示すように両者とも6.9~7.5の範囲にあり、本株ではpH値は、増殖の制限因子とはなっていない。したがって、上記の差は、次の理由による。比較例の溶存酸素濃度は、第10図に示すように細胞濃度が 1.4×10^6 個/ml 以上でほとんどゼロとなり、増殖の制限因子となつている。これに対して、本発明では実施例1で示すように高い酸素移動速度が得られるので培養終了まで溶存酸素濃度を1.8~2.6 ppm とすることができ、増殖に必要な酸素を十分に供給できたから

(21)

である。

また、培養期間を通して著しい発泡はなく、培養終了時の細胞生存率は85%で培養開始時の88%と比べ大きな減少はなかった。

以上から、本発明により酸素含有ガスとして空気を用いた場合でも細胞を従来法の3倍強の高密度で培養できることが確認できた。

ところで、本発明では溶存炭酸ガスの液相と気相の置換が良好に行なえる。これは、液面での凹み形成を開始した時点のpHの変化に現られている。比較例ではpH値は低下するのに対して、本発明では上昇した。即ち本発明では酸素含有ガスを液面に吐出して液面に凹みを形成することで液相－気相間の気体に物質移動を促進し液相の炭酸ガスを良好に気相に排出できたからである。また、炭酸ガス生成速度の高い高密度培養でも、本発明では液相－気相間の気体の物質移動速度を高くできるので、炭酸ガス濃度の低い酸素含有ガスを利用することで液相から気相への炭酸ガスを排出できる。このため、第11図に示すように溶存炭酸ガスの蓄積に伴うpH値の低下を抑えることができた。

〔発明の効果〕

本発明によれば、機械攪拌式の培養槽において槽上部の気相と培養液の液相間との気体の物質移動を培養の発

(22)

泡を抑えて促進できる。

(23)

請求の範囲

1. 動物細胞を機械攪拌式の培養槽にて培養するに当り、培養液の攪拌を液面の乱れやボルテックス形成を抑えながら行ない、かつ吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて連続的に吐出し、液面に凹みを形成させることを特徴とする動物細胞の培養方法。
2. 特許請求の範囲第1項において、吹き込みノズル先端から静止液面までの距離を h としたとき、酸素含有ガスの吹き込み量とノズル先端でのガス線速度との積が $6.25 \times 10^5 \times h^2$ 以下となるように上記ガスを吐出することを特徴とする動物細胞の培養方法。
3. 特許請求の範囲第1項において、吹き込みノズル穴径1 mmのノズルから吐出する酸素含有ガスの液面での垂直方向に対する線速度を 5 m/s 以上 65 m/s 以下となるように上記ガスを吐出することを特徴とする動物細胞の培養方法。
4. 動物細胞を機械攪拌式の培養槽にて培養する装置において、液面上部の気相空間に酸素含有ガスを連続的に吐出するための単一もしくは複数個の気体吹き込みノズルを液面に向けて設置したことを特徴とする動物細胞の培養装置。
5. 特許請求の範囲第4項において、培養液を攪拌するための攪拌羽根が、中央部を抜いた矩形板を1/2回

(24)

転ひねった構造であることを特徴とする動物細胞の培養装置。

6. 動物細胞を分散した培養液を攪拌機で攪拌しながら培養槽にて培養するにあたり、培養液の液面を実質上平滑に保ちつつ培養液の攪拌を行い、かつ多数の吹き込み穴を有する吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて連続的に吐出し、液面に多数の凹みを形成させ酸素ガスを培養液に溶解することを特徴とする動物細胞の培養方法。

7. 動物細胞を分散した培養槽の培養液を機械攪拌しながら培養する方法において、培養液の発泡及び該動物細胞の破壊を防止しながら培養液の攪拌をすること、及び吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて吐出し、液面に凹みを形成させながら酸素ガスを培養液に溶解させること、を有することを特徴とする動物細胞の培養方法。

8. 動物細胞を機械攪拌式の培養槽にて培養するにあたり、培養液の攪拌を液面の乱れやボルテックス形成を抑えながら行い、かつ吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて連続的に吐出し、液面に凹みを形成し凹みの底部から液面に向かう培養液の流れを形成しつつ酸素ガスを培養液に溶解させることを特徴とする動物細胞の培養方法。

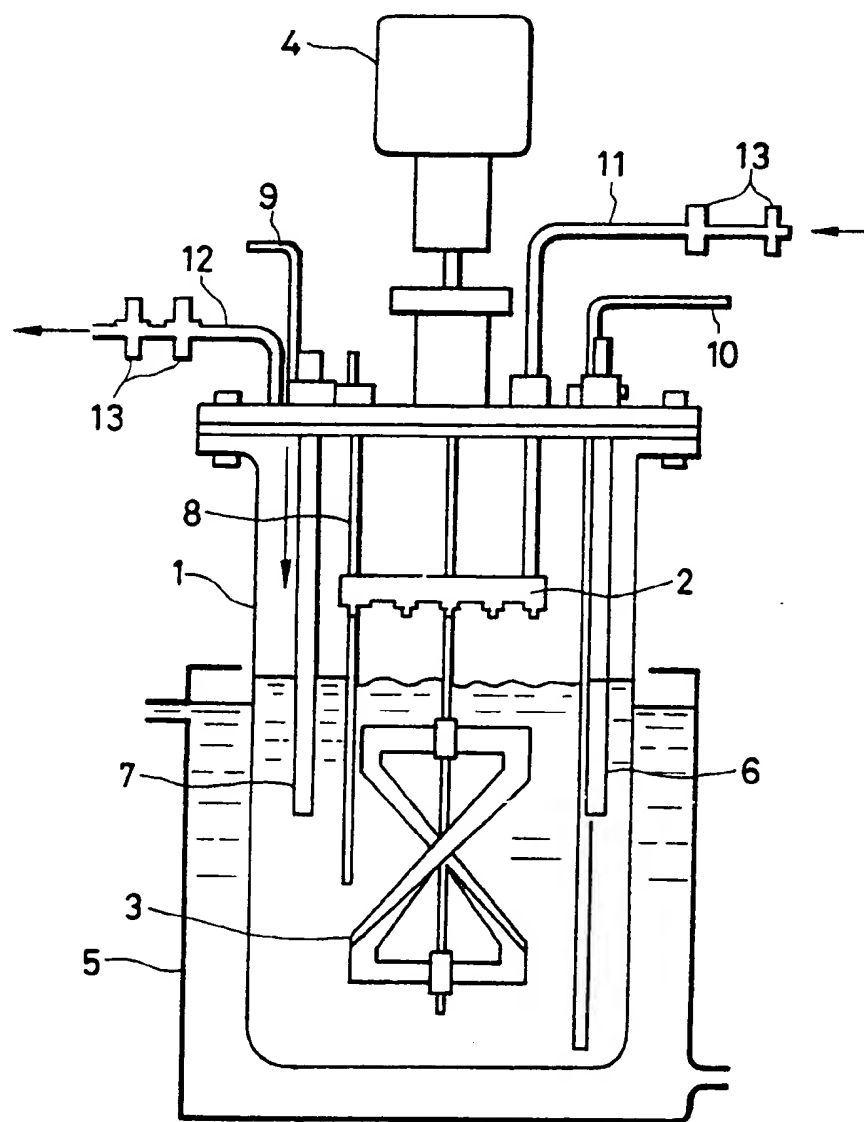
(25)

9. 動物細胞を分散する培養液を収容する培養槽と、該培養液を攪拌する攪拌機と及び該培養液の液面に酸素ガスを供給する手段とを有する培養装置において、液面上部の気相空間に、酸素含有ガスを液面に向けて連続的に吐出するための気体吹き込みノズルを設置したことを特徴とする動物細胞の培養装置。
10. 動物細胞を分散する培養液を収容する培養槽と、該培養液を攪拌する攪拌機と及び該培養液の液面に酸素ガスを供給する手段とを有する培養装置において、液面上部の気相空間に、酸素含有ガスを液面に向けてほぼ垂直に吐出するための気体吹き込みノズルを設置したことを特徴とする動物細胞の培養装置。
11. 動物細胞を分散する培養液を収容する培養槽と、該培養液を攪拌する攪拌機と及び該培養液の液面に酸素ガスを供給する手段とを有する培養装置において、酸素含有ガスを液面に向けてほぼ垂直に吐出するための気体吹き込みノズルと、該ノズルからの吐出圧力を制御し該液面に凹みを形成する制御手段を有することを特徴とする動物細胞の培養装置。
12. 培養槽の培養液に分散された動物細胞を機械攪拌しながら培養する方法において、培養液の発泡及び該動物細胞の破壊を防止しながら培養液の攪拌をすること、及び吹き込みノズルから酸素含有ガスを液面に向けて

(26)

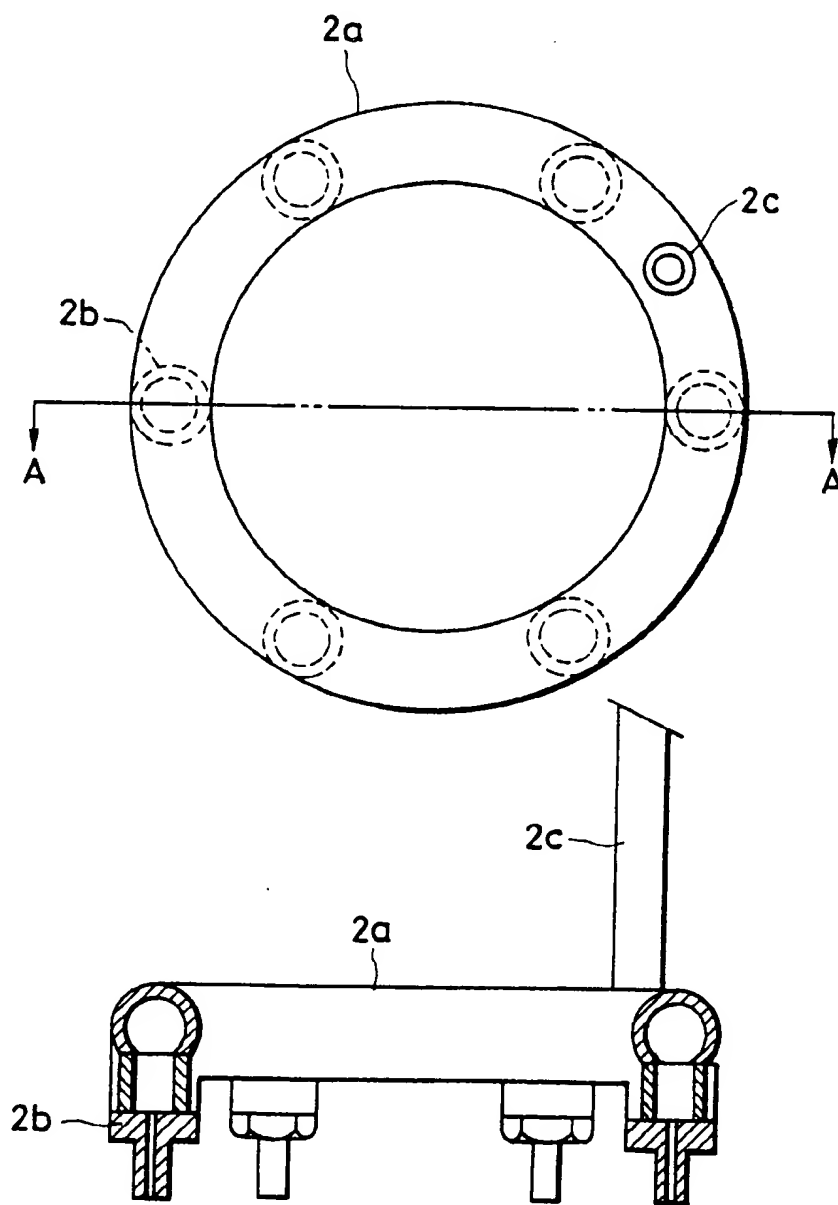
垂直方向に 5 m / 秒 ~ 65 m / 秒 (但しノズルの穴径を 1 mm として計算した場合の液面での線速度) の速度で吐出し、液面に凹みを形成させながら酸素ガスを培養液に溶解させること、を有することを特徴とする動物細胞の培養方法。

第 1 図



2/8

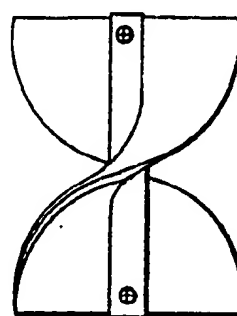
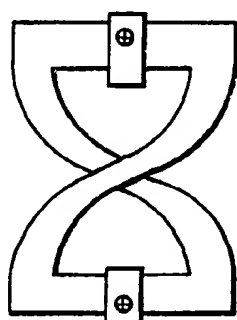
第 2 図



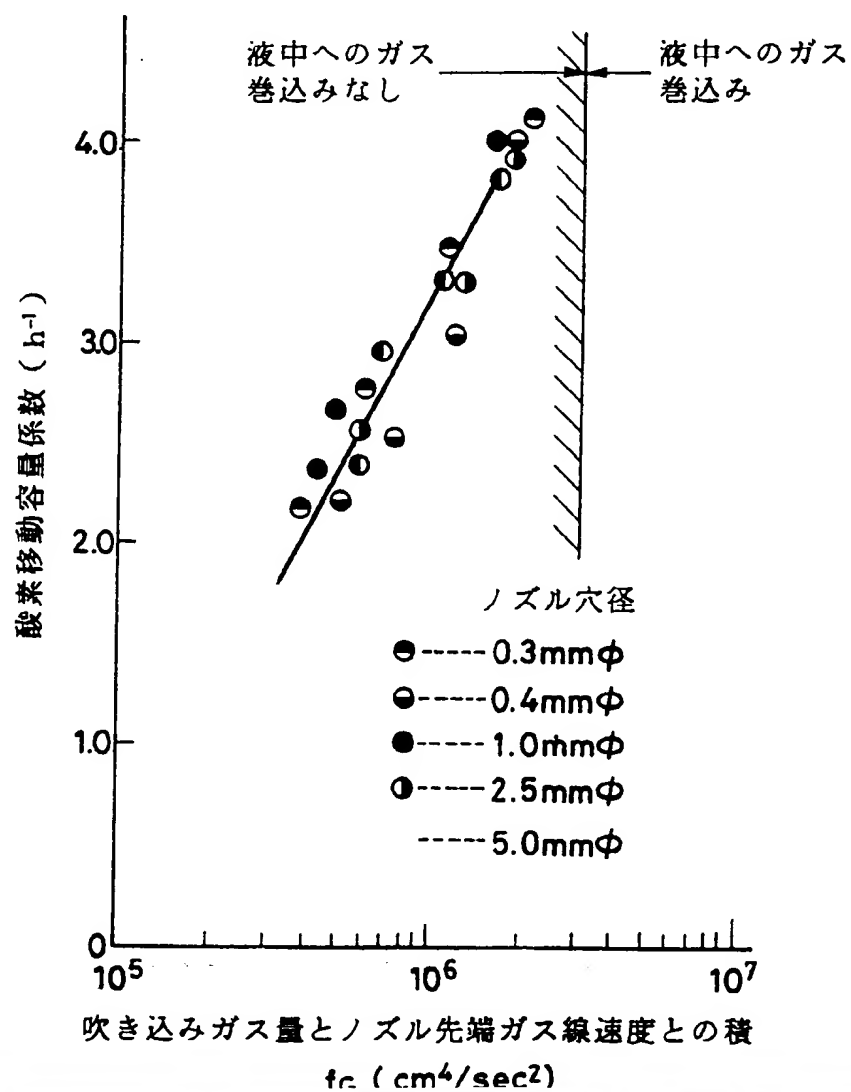
3/8

第 3 図(a)

第 3 図(b)

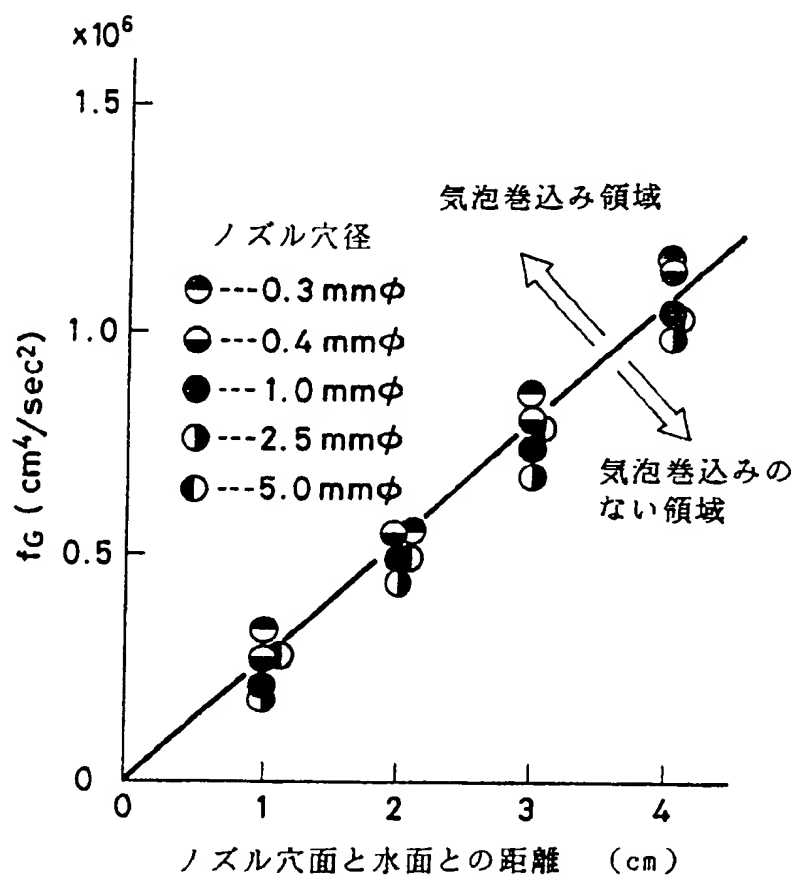


第 4 図

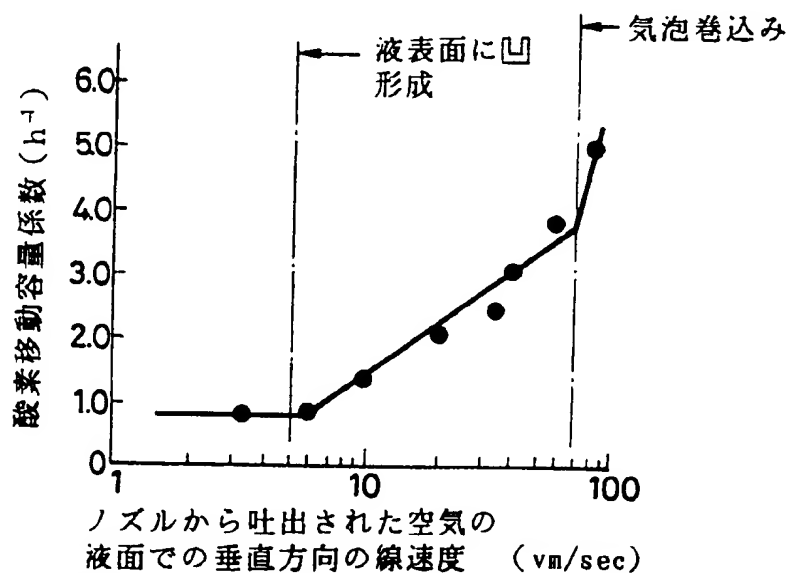


4/8

第 5 図

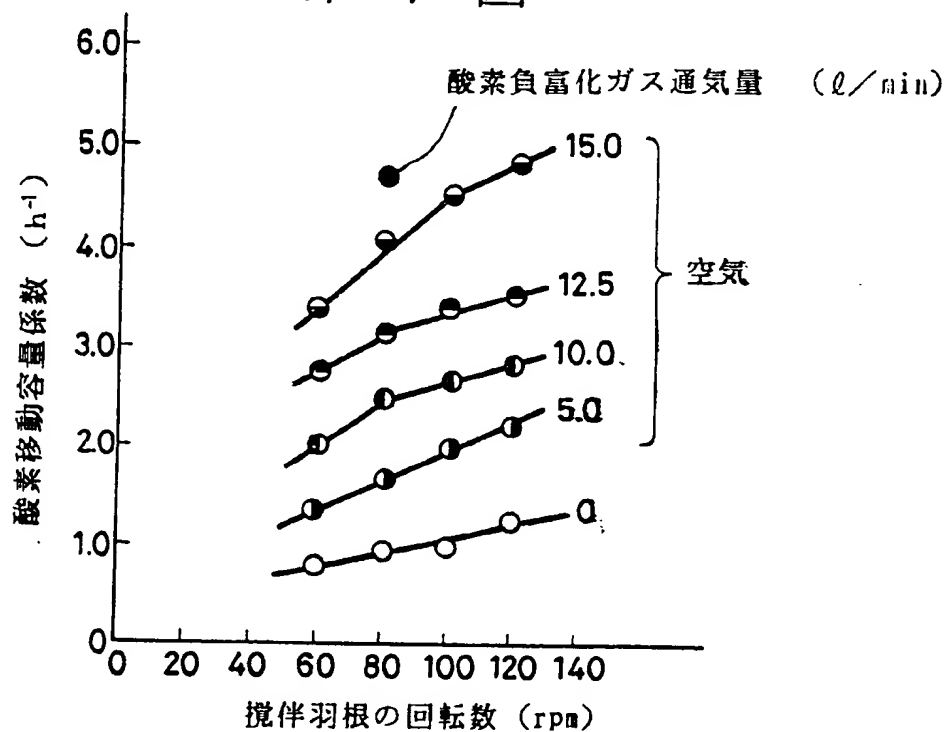


第 6 図

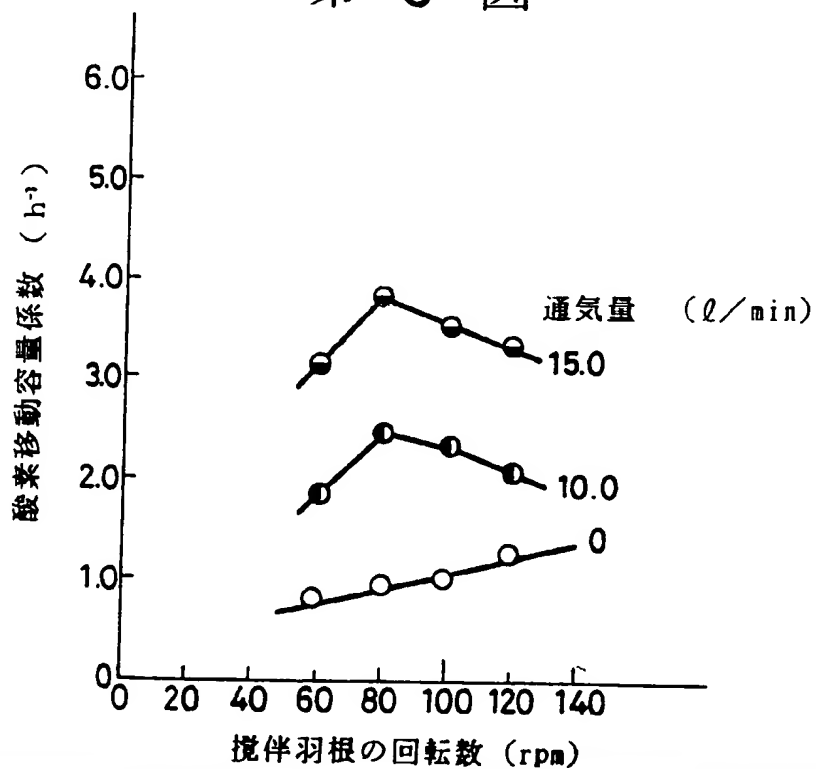


5/8

第 7 図

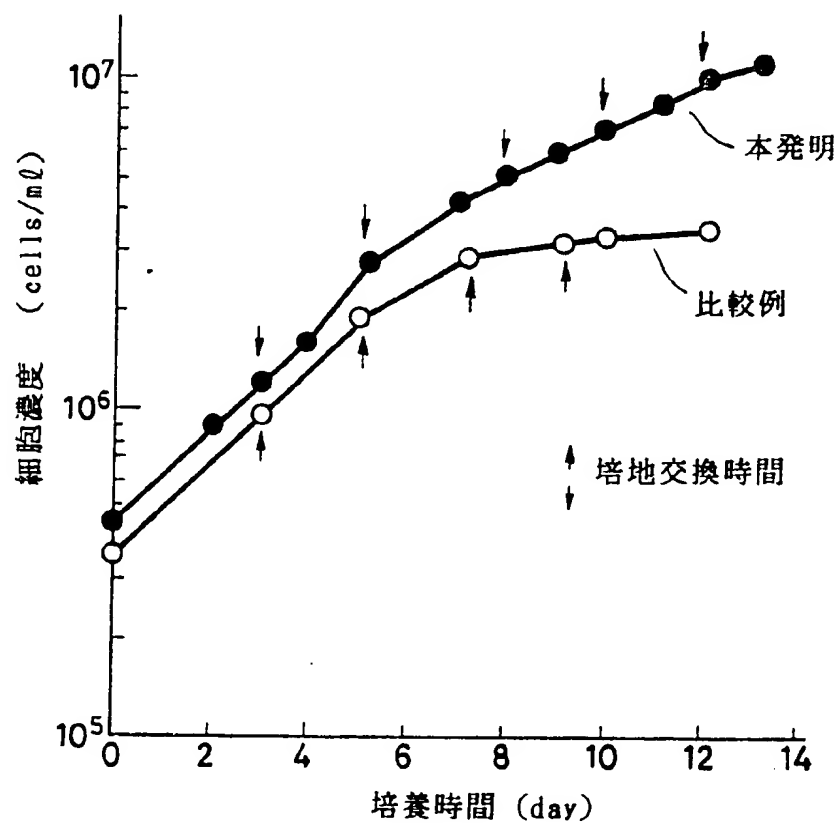


第 8 図



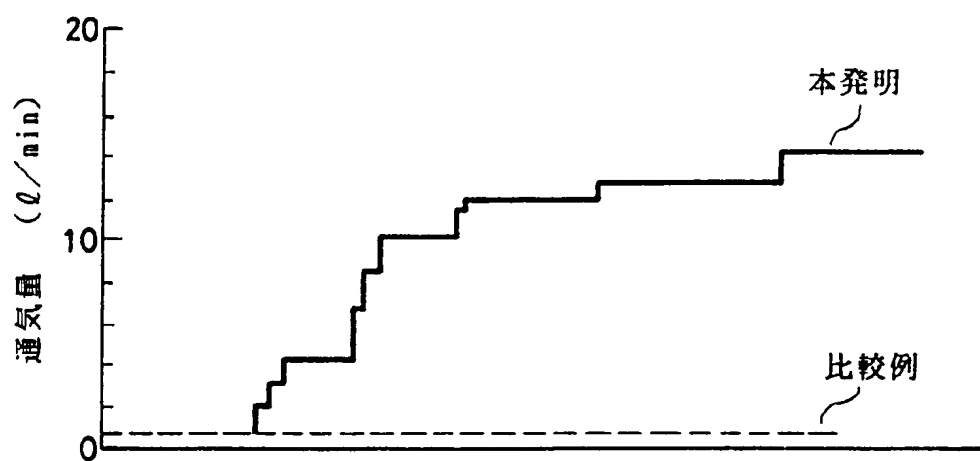
6/8

第 9 図

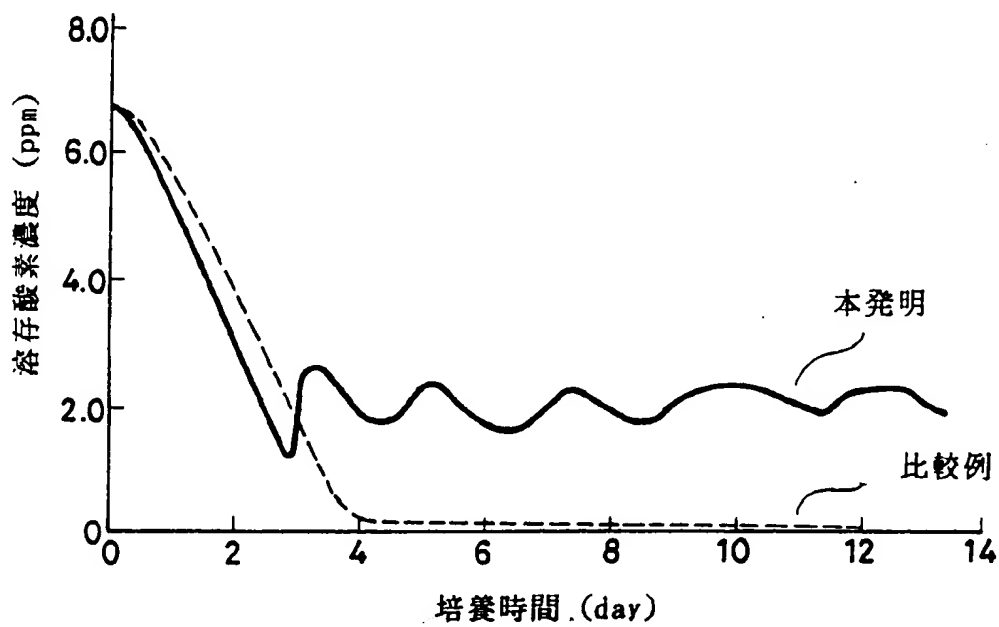


7/8

第 10 図(a)

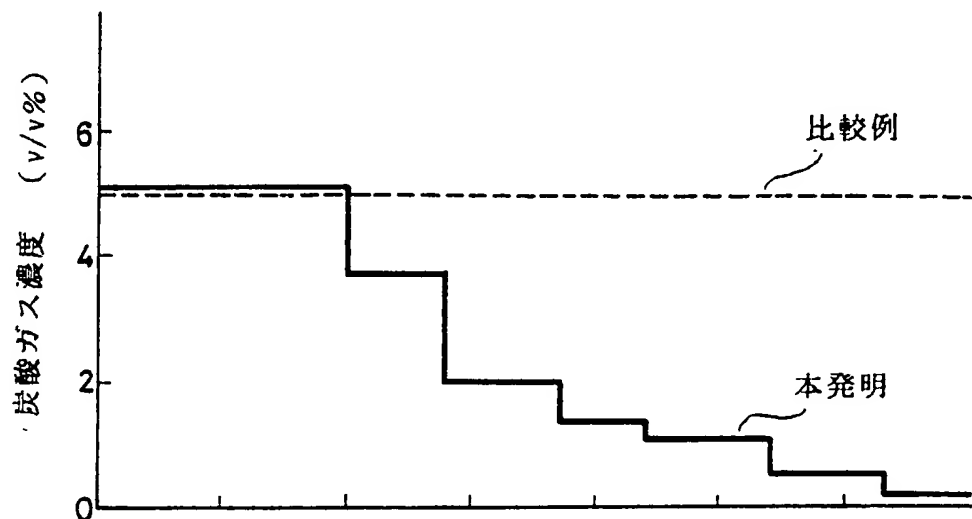


第 10 図(b)

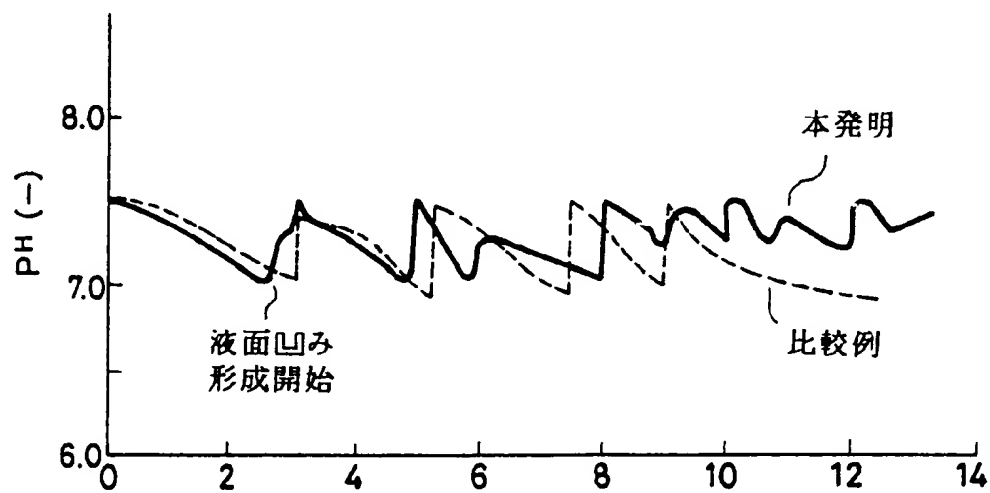


8/8

第 11 図(a)



第 11 図(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP87/00572

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ³

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.C1⁴ C12M3/00, C12N5/00 //C12M1/06

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁴

Classification System ¹

Classification Symbols

IPC C12M3/00, C12N5/00, B01F7/00

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵

Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1987
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1987

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴

Category ⁶	Citation of Document, ¹⁵ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
A	Canadian Journal of Chemical Engineering, Vol.64, No.4, (1986), S.R. Adamson, B. Schmidel [Industrial mammalian cell Culture] P.531-539	1-12
A	JP, Y1, 44-19179 (Ebara-Infilco Co., Ltd.) 18 August 1969 (18. 08. 69) (Family: none)	4-5, 9-11
A	JP, U, 57-164600 (Hitachi, Ltd.) 16 October 1982 (16. 10. 82) (Family: none)	5

* Special categories of cited documents: ¹⁹

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search ²

October 9, 1987 (09. 10. 87)

Date of Mailing of this International Search Report ²

October 26, 1987 (26. 10. 87)

International Searching Authority ¹

Japanese Patent Office

Signature of Authorized Officer ²⁰

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 87/ 00573

I. 発明の属する分野の分類			
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C12M3/00, C12N5/00//C12M1/06			
II. 国際調査を行った分野			
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料			
分 類 体 系	分 類 記 号		
IPC	C12M3/00, C12N5/00, B01F7/00		
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの			
日本国実用新案公報		1926-1987年	
日本国公開実用新案公報		1971-1987年	
III. 関連する技術に関する文献			
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		請求の範囲の番号
A	Canadian Journal of Chemical Engineering. 第64巻, 第4号, (1986), S.R. Adamson, B. Schmidel 「Industrial mammalian cell Culture」 P.531-539		1-12
A	JP, Y1, 44-19179 (荏原インフィルコ株式会社) 18. 8月, 1969 (18. 08. 69) (ファミリーなし)		4-5, 9-11
A	JP, U, 57-164600 (日立製作所) 16. 10月, 1982 (16. 10. 82) (ファミリーなし)		5
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリーの文献</p>			
IV. 認 証			
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日	
09. 10. 87		26.10.87	
国際調査機関		権限のある職員	
日本国特許庁 (ISA/JP)		4B 8717	
		特許庁審査官	
		後 藤 圭 次	